

# クライオ電子顕微鏡を用いたATP動態を担う蛋白質の構造解析

Analysis of Structural Changes of Protein Complex Induced by ATP using Cryo-Electron Microscopy

ユーザー氏名 / User's Name :

中西温子<sup>ab</sup>, 中野敦樹<sup>a</sup>, 岸川淳一<sup>ac</sup>, 横山謙<sup>a</sup> / Atsuko Nakanishi<sup>ab</sup>, Atsuki Nakano<sup>a</sup>, Jun-ichi Kishikawa<sup>ac</sup>, Ken Yokoyama<sup>a</sup>  
(<sup>a</sup>京都産業大学, <sup>b</sup>大阪大学, <sup>c</sup>京都工芸繊維大学 / <sup>a</sup>Kyoto Sangyo University, <sup>b</sup>Osaka University, <sup>c</sup>Kyoto Institute of Technology)

実施機関担当者 / Person in Charge of ARIM :

光岡薫 / Kaoru Mitsuoka (大阪大学 / Osaka University)

## KEY WORDS

Cryo-Electron Microscopy; Single Particle Analysis; ATP synthase; ATPase; Enzyme Mechanism; Molecular Motor; Time-Resolving Snapshot Analysis

## 概要 / Overview

タンパク質や複合体の機能の詳細を理解するためには、それらの構造や変化を明らかにすることが必要である。単粒子クライオ電子顕微鏡法では、大量に撮影した電子顕微鏡画像を用いて、それらを画像分類後、平均化することで高分解能の立体構造を計算する。その画像分類により、共存する複数構造のスナップショットを得ることができる。また、この手法では、タンパク質等が存在する環境の条件を比較的容易に変えることができるので、その構造変化に対応する複数の構造スナップショットも得ることができる。そこで本研究では、ATPの加水分解エネルギーで回転する分子モーターであるタンパク質複合体について、それらの機能と関連する複数構造を明らかにし、それらの酵素活性機構などに関する知見を得た。

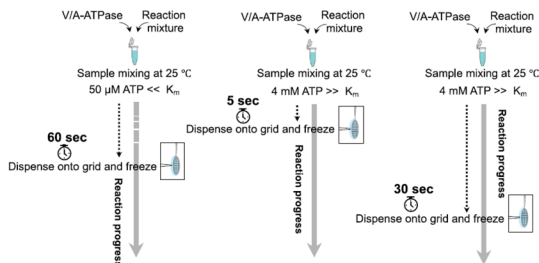
To understand the molecular details of the functions of protein complexes, it is necessary to determine the high-resolution structures and their changes of the complexes. Using single-particle cryo-electron microscopy, the structures of proteins can be determined from a large volume of images collected by cryo-electron microscopy after image classification and averaging. By the image classification, several structural snapshots in the same solution can be obtained. In addition, the environmental conditions can be easily changed in this technique and therefore the several snapshots related to the structural changes can be visualized. Here we identified the cryo-electron microscopy structures of ATPases, which are molecular rotary motor driven by ATP hydrolysis, corresponding to intermediates in function. These intermediate structures provide insights into how the structural changes are related to the binding of ATP to its catalytic sites.

## 時間分解急速凍結法の模式図

Schematic Representations of Rapid Freezing for Time-Resolved Snapshots

### ● 時間分解急速凍結法や効率的な自動データ収集法の導入

我々は、タンパク質やその複合体の構造変化を可視化するため、時間分解急速凍結法を導入した(Nakanishi et al. *JBC* 2023)。さらに、大量の画像を収集するため、ステージ移動無しでの複数画像収集などの効率的なデータ収集法も導入した。これらを用いて、回転ATPアーゼの構造変化に関する研究を行った。右研究に用いた時間分解急速凍結法の模式図を下に示す。

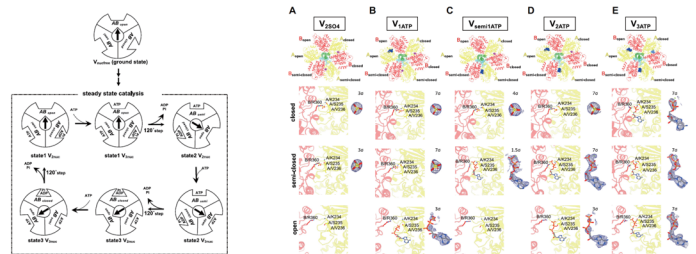


## ATPを結合していない状態からの構造変化の可視化

V/A-ATPase intermediates from the ground-state to steady-state by sequential ATP binding

### ● V/A-ATPアーゼの基底状態から回転定常状態への遷移

V/A-ATPアーゼは、古細菌などに存在し、膜のイオン勾配を用いたATP合成を主に行う膜タンパク質複合体である。その水溶性部分は左下図のようにATP結合部位を持つ三量体であり、その構造変化により軸が回転する回転触媒機構によりATPを合成する。そのATPを結合していない基底状態から、ATPを結合して軸を回転する定常状態への遷移に伴う構造変化を明らかにした。その遷移に伴う構造スナップショットを右下図に示す(Nakanishi et al. *JBC* 2023)。

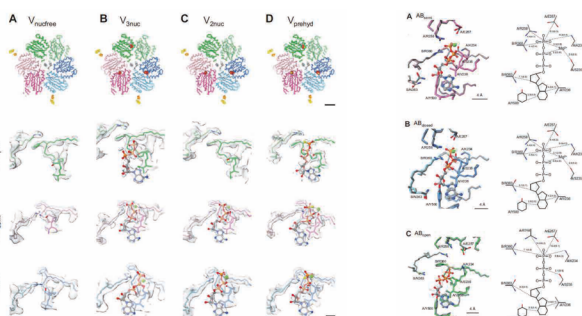


## 回転中のV/A-ATPアーゼの構造スナップショット

Structural snapshots of V/A-ATPase reveal the rotary catalytic mechanism of rotary ATPases

### ● V/A-ATPアーゼの回転中の構造変化

溶液条件を比較的簡単に変更できる単粒子クライオ電子顕微鏡法の特徴を活かし、異なる反応条件下でのV/A-ATPアーゼの18種類の構造を明らかにした。その異なるヌクレオチド結合状態にある複数の構造を左下図に示した。ヌクレオチド結合部位を示した上図のスケールバーは20Åで、ヌクレオチドの分子モデルを示した下図のスケールバーは4Åとなる。右下図には、そのヌクレオチド結合の詳細を示した(Kishikawa et al. *Nat. Commun.* 2022)。



## 細菌F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素の回転による加水分解機構

Mechanism of ATP hydrolysis dependent rotation of bacterial ATP synthase

### ● 細菌由来のF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素での回転構造スナップショット

同じく回転触媒機構で機能する膜タンパク質複合体として、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素がある。我々は、細菌由来のF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素について、同じく単粒子クライオ電子顕微鏡法により、その触媒中間体の複数の構造を明らかにした。左下図に、その回転の素過程と、今回得られた複数構造の関係を示し、右下図に、ヌクレオチド結合部位や、そこでのヌクレオチドの構造などを示した(Nakano et al. *Nat. Commun.* 2023)。

